บทคัดย่อ

จากการทดลองเก็บตัวอย่างมูลค้างคาวในวัดถ้ำสุวรรณคูหา อ. ตะกั่วทุ่ง จ. พังงา รวม 50 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อรวม 75 สายพันธุ์ได้ภายหลังการทดสอบความสามารถในการสร้างและขับโปรตีเนสออกนอกเซลล์ด้วยวิธี agar plate assay โดยใช้ NA ที่มี pH 8.0 และมี skim milk 1% และภายหลังการทดสอบกิจกรรมโปรตีเนสโดยวิธี Folin-Ciocalteau assay พบว่าสายพันธุ์ PN51 (Phang Nga 51) มีกิจกรรมโปรตีเนสสูงสุด จากการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA ของสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่ามีความเหมือนถึง 100% กับ *Bacillus* sp. CNJ904 PLO4 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีเนสคืออาหารที่ดัดแปลงสูตรมาจาก Lee ประกอบด้วยเปปโทน 1.0% สารสกัดยีสต์ 0.5% $CaCl_2$ 0.04% และ $MgCl_2$ 0.02% ซึ่งมีหัวเชื้อ 0.5% ที่ pH 8 โดยเขย่าที่ความเร็ว180 rpm ที่ 35°C เป็นเวลา 22 ชั่วโมง เอนไซม์ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต DEAE-cellulose DE52 และ Mono Q FPLC มวลโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 35 kDa เอนไซม์ให้กิจกรรมสูงสุดที่ 50°C และ pH 10.0 และมีความคงตัวที่ pH ในช่วง 7-10 ภายหลังการบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 20 ชม. และทนได้ถึง 60°C ที่ pH 10.0 เป็นเวลา 1 ชม. กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย PMSF และ chymostatin แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย EDTA ลำดับของกรดอะมิโนด้านปลายหมู่อะมิโนรวม 25 เรซิดิว คือ NH_2-Y-V-P-N-D-P-A-Y-K-Q-Q-Y-A-P-Q-K-V-G-T-E-Q-A-W-D-T ซึ่งมีความคล้ายประมาณ 70% กับ halolysin precursor ของ *Natrialba asiatica* and halolysin-like extracellular serine protease ของ *Natrialba magadii* ดังนั้นโปรตีเนสของสายพันธุ์ PN51 เป็นชนิดเซรีนที่มีกิจกรรมของโคโมทริปซิน

Abstract

A total of 75 bacterial strains producing proteinase were outside the cells screened from 50 samples of bat faeces in Wat Suwankuha cave, Takua Thung District, Phang Nga, Thailand, by agar plate assay. The results showed that strain PN51 (Phang Nga 51) gave the highest proteinase activity in the casein Folin-Ciocalteau assay. The 16S rDNA sequence analysis of PN51 showed a 100% homology correlation to that of *Bacillus* sp. CNJ904 PLO4. Maximal proteinase production occurred at pH 8, 180 rpm, 35°C in a modified Lee's medium containing 1.0% peptone, 0.5% yeast extract, $CaCl_2$ 0.04% and $MgCl_2$ 0.02% with 0.5% starter for 22 hr. The enzyme was purified in a 3-step procedure involving ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose DE52 and Mono Q FPLC. Molecular mass of the major band was estimated to be 35.0 kDa. The enzyme, which showed the highest activity at 50°C and pH 10.0, was stable in a pH range from 7 to 10 after treatment at 4°C for 20 hr and up to 60°C at pH 10 for 1 hr. The activity was strongly inhibited by phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), and chymostatin, but not by EDTA. The amino-terminal's 25 amino acids' sequence was NH_2-Y-V-P-N-D-P-A-Y-K-Q-Q-Y-A-P-Q-K-V-G-T-E-Q-A-W-D-T, which is up to about 70% identical with those of *Natrialba asiatica* halolysin precursor and *Natrialba magadii* halolysin-like extracellular serine protease. Thus, the enzyme from the strain PN51 was thought to be a serine-type with chymotrypsin activity.

Keywords: bat faeces, *Bacillus*, PMSF, chymostatin, serine-type proteinase